在藏羚羊上发现的中国第四种皮蝇

庞 程[1,2]，蔡进忠[3]，高兴春[4]，李春花[3]，曹 杰[1]，徐梅倩[1]，刘生财[3]，黄 燕[1]，朱顺海[1]，Chantal BOULARD[5]，何国声[1,*]

（1. 中国农业科学院上海兽医研究所，中国农业部动物寄生虫重点开放实验室，上海 200232；
2. 华中农业大学动物医学院，武汉 430070；3. 青海省畜牧兽医学院兽医研究所，西宁 810003；
4. 上海交通大学生命科学技术学院，上海 200240；
5. Laboratoire de Immunopathogie des Maladies Parasitaires，Station de Pathologie Aviaire et Parasitologie，INRA，37380 Nouzilly，France）

摘要：对于从可可西里藏羚羊上采集到的藏羚羊皮蝇 *Hypoderma* sp.3 龄幼虫进行了形态学观察，发现其在伪头、第10腹节上的刺、气门板形态上与中国现有记录的 3 种皮蝇（牛皮蝇、纹皮蝇和中华皮蝇）有着明显的区别。对藏羚羊皮蝇的线粒体 COI 基因种属特异性序列研究表明，其与牛皮蝇、纹皮蝇和中华皮蝇对应序列的相似性分别为 88.1%，87.8%和 88.8%。据此认为采自藏羚羊的此种皮蝇可能为中国境内又一皮蝇新种或新记录种，为中国第四种皮蝇。

关键词：藏羚羊；皮蝇；牛皮蝇；纹皮蝇；中华皮蝇；形态学；COⅠ基因

中图分类号：S186，Q969　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2008)10-1099-04

A fourth species of *Hypoderma*（Diptera：Oestridae）found from Tibetan antelope in China

PANG Cheng[1,2]，CAI Jin-Zhong[3]，GAO Xing-Chun[4]，LI Chun-Hua[3]，CAO Jie[1]，XU Mei-Qian[1]，Liu Sheng-Cai[3]，HUANG Yan[1]，ZHU Shun-Hai[1]，Chantal BOULARD[5]，HE Guo-Sheng[1,*]（1. Shanghai Veterinary Research Institute，Chinese Academy of Agricultural Sciences，Shanghai 200232，China；2. College of Animal Science and Veterinary Medicine，Huazhong Agricultural University，Wuhan 430070，China；3. Veterinary Research Institute，Qinghai Academy of Veterinary and Husbandry，Xining 810003，China；4. School of Life Sciences and Biotchnology，Shanghai Jiaotong University，Shanghai，200240，China；5. Laboratoire de Immunopathogie des Maladies Parasitaires，Station de Pathologie Aviaire et Parasitologie，INRA，37380 Nouzilly，France）

Abstract: Based on morphological observations on the 3rd instar larvae of a *Hypoderma* species infecting Tibetan antelopes from Kekexili（Hoh Xil），we found that their pseudocephalon，the spines on the tenth ventral segment and the shape of spiracular plates show lots of differences from those of *H. bovis*，*H. lineatum* and *H. sinense*，which all occur in China. The molecular analysis of mitochondrial gene encoding the subunit I of cytochrome oxidase（COI）also showed that the similarity between the *H.* sp. from Tibetan antelopes and *H. bovis*，*H. lineatum* and *H. sinense* were 88.1%，87.8% and 88.8%，respectively. Therefore，the *H.* sp. found in Tibetan antilopes is believed to be a new or newly recorded species of warble fly in China，a fourth species of *Hypoderma* in China.

Key words: Tibetan antilope；warble fly；*Hypoderma bovis*；*Hypoderma lineatum*；*Hypoderma sinense*；morphology；COI gene

皮蝇蛆病是一种严重影响我国畜牧业，特别是我国西部地区食草动物的重要寄生虫病，且在感染

基金项目：国家自然科技资源平台项目（2004DKA30480）
作者简介：庞程，男，1982 年生，浙江绍兴人，硕士，从事兽医寄生虫研究，E-mail：pangcheng1982@yahoo.com.cn
* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：he-guosheng@yahoo.com.cn
收稿日期 Received：2008-04-30；接收日期 Accepted：2008-09-22

严重地区有人被感染的病例。我国目前已记录的牛皮蝇主要有 3 个种，即牛皮蝇 *Hypoderma bovis*，纹皮蝇 *H. lineatum* 和中华皮蝇 *H. sinense*（Otranto *et al*.，2004），它们主要寄生于牦牛、黄牛，偶尔寄生于羊、鹿、麝、野牛、马等动物（Robert and James，1979），没有确切记载藏羚羊感染皮蝇蛆的资料（Otranto *et al*.，2005）。

藏羚羊主要生活在我国青藏高原（西藏、青海和新疆），也有少量分布在印度拉达克地区。这些地区气候条件恶劣，年平均温度低于零度，生长季节短。迄今为止，只有国外学者基于藏羚羊尸体通过细胞学和分子生物学作了一些工作，对藏羚羊寄生虫及疫病调查和研究报道很少（蔡进忠等，2006）。

我们在执行国家自然科技资源平台"重要寄生虫虫种资源标准化整理、整合和共享试点"项目中，基于产自可可西里的 6 只藏羚羊公羊活体、3 只藏羚羊母羊活体皮肤表面检查和野外偶然遇到死后不久的 2 只藏羚羊成年母羊尸体剖检，在其臀部得到了大量的皮蝇 3 龄幼虫。结果表明，藏羚羊感染的均为同一种皮蝇蛆（暂定为藏羚羊皮蝇蛆 *Hypoderma* sp.），其感染率为 100%，平均感染强度为每头 137.4 条（67～267 条）。为了明确其分类地位，本文主要根据形态学观察和最具属种代表性的 COI 基因（线粒体细胞色素氧化酶亚单位Ⅰ基因）序列分析对藏羚羊皮蝇进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 蝇蛆采集与形态学观察

对捕获的或刚死亡的藏羚羊做臀部皮肤虫孔或瘤疱检查，并计数，挑取即将脱落的 3 龄幼虫于 70%酒精中 4℃保存。对收集的样品以及牛皮蝇、纹皮蝇和中华皮蝇等的样品均在解剖镜下观察。

1.2 样品处理和 DNA 提取

将保存在 70%酒精中的藏羚羊皮蝇 3 龄幼虫样品取出，放入的 15 mL 的离心管中用灭菌水漂洗 20 min。取出清洗干净的幼虫单个个体，解剖出虫体内容物，60℃干燥 15 min，用 DNA 提取试剂盒（QIAamp DNA Mini Kit，Qiagen GmbH，Germany）提取 DNA。1 个体为 1 个重复，共 15 个重复。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

根据资料（Zhang and Hewitt，1997），设计了皮蝇线粒体 COI 种属特异性基因片段扩增所需引物，由赛百盛生物技术公司合成。上游引物 UEA7（C1-J-2369）：5′-TAC AGT TGG AAT AGA CGT TGA TAC-3′；下游引物 UEA10（TL2-N3014）：5′-TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A-3′。按下列条件进行 PCR 扩增：94℃预变性 8 min；94℃ 变性 1 min，60℃退火 1 min，72℃延伸 1 min，40 个循环；72℃延伸 7 min。

1.5 测序及序列分析

PCR 扩增产物经切胶回收克隆入 pMD-19T 载体（宝生物工程有限公司）中，挑取经 PCR 检测含目的基因的单克隆送 Invitrogen 公司测序。用 Clustal X 1.83 对相关蝇类的线粒体 COⅠ基因进行比对；用 MEGA3.1 进行聚类分析，并绘制进化树。

2 结果与分析

2.1 形态学特征

2.1.1 伪头：藏羚羊皮蝇 *Hypoderma* sp.伪头有两个明显的大的圆锥形肉质突起；牛皮蝇伪头没有肉质突起；纹皮蝇和中华皮蝇有两个小的退化的突起。藏羚羊皮蝇伪头突起与口沟之间有一排较大的横向大型尖刺；牛皮蝇相应部位同样有一排横向小刺，但为小型刺；纹皮蝇和中华皮蝇相应部位没有横向刺。藏羚羊皮蝇伪头第 2 节上的刺为大型刺，而牛皮蝇、纹皮蝇、中华皮蝇的为小型刺（图 1：A～D）。

2.1.2 第 10 腹节腹面上的刺：藏羚羊皮蝇第 10 腹节腹面上呈现前后两排刺，前排刺明显较大，且连续；牛皮蝇第 10 腹节腹面前后排均无刺；纹皮蝇第 10 腹节仅后排有刺（图 1：E～H）。

2.1.3 气门板：藏羚羊皮蝇气门板较厚，呈平面状，C-环闭合；牛皮蝇气门板较薄，凹陷，C-环基本闭合；纹皮蝇气门板较薄，凹陷，C-环有明显缺口；中华皮蝇气门板较厚，呈平面状，C-环闭合（图 1：I～L）。

2.2 COI 基因序列比较

将测得的藏羚羊皮蝇 15 个重复的 8 条不同 COI 序列（GenBank 序列号：EU276101 – EU276108）与牛皮蝇、纹皮蝇和中华皮蝇以及其他国外皮蝇种的序列进行了比对，藏羚羊皮蝇种内变异率为 0.84%，与牛皮蝇相应片段的相似性为 88.1%，与纹皮蝇的相似性是 87.8%，与中华皮蝇的相似性为 88.8%，与鹿皮蝇 *H. diana*，驯鹿皮蝇 *H. tarandi*，红鹿皮蝇 *H. acteaon*，山羊隧皮蝇 *Przhevalskiana silenus* 和羊狂蝇 *Oestrus ovis* 的相似性分别为 86.8%，85.6%，83.6%，82.1% 和 78.6%，平均变异率为 11.9%。系统进化树分析结果如图 2。

图 1　牛皮蝇、纹皮蝇、中华皮蝇和藏羚羊皮蝇 3 龄幼虫形态学比较

Fig.1　Morphological comparison of *Hypoderma bovis*，*H. lineatum*，*H. sinense* and *H.* sp.

A ~ D：依次为牛皮蝇、纹皮蝇、中华皮蝇、藏羚羊皮蝇 3 龄幼虫伪头，藏羚羊皮蝇伪头上有明显的两个大的圆锥形肉质突起，并有一排较大的横向大型尖刺；E ~ H：依次为牛皮蝇、纹皮蝇、中华皮蝇、藏羚羊皮蝇 3 龄幼虫第 10 腹节腹面上的刺。箭头所指为藏羚羊皮蝇第 10 腹节腹面前排大而连续的刺，明显区别于其他皮蝇；I ~ L：依次为牛皮蝇、纹皮蝇、中华皮蝇、藏羚羊皮蝇 3 龄幼虫的气门板。藏羚羊皮蝇气门板为厚质闭合的 C 环，区别于牛皮蝇纹皮蝇的凹陷状。A – D：Pseudocephalon of *H. bovis*，*H. lineatum*，*H. sinense* and *H.* sp. Note the two large fleshy，conical prosuberances on pseudocephalon and the large transverse pointed scales in the middle of the first segment for *H.* sp. E – H：Spines on the tenth ventral segment of *H. bovis*，*H. lineatum*，*H. sinense* and *H.* sp. Arrow（Fig.1：H）points the large and continuous spines on the tenth ventral segment of *H.* sp.，which differs from other species. I – L：The spiracular plates of *H. bovis*，*H. lineatum*，*H. sinense* and *H.* sp. *H.* sp. has flat and closed C-shaped spiracular plates，distinguished from the concaved C-shaped of *H. bovis* and *H. lineatum*. 标尺 Bar = 1 mm.

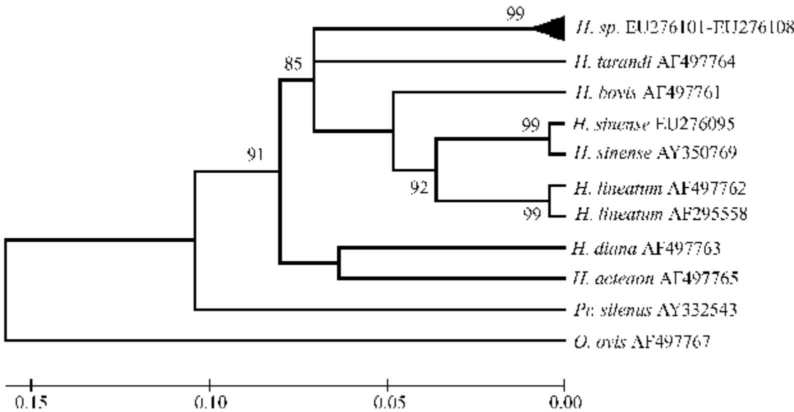


图 2　基于 COI 部分序列（E4-COOH 部分）得到的藏羚羊皮蝇在系统发育树上的位置

Fig.2　*Hypoderma* spp. in the phylogenic tree based on COI gene partial sequence（part of E4-COOH）

基于 MEGA3.1 相邻连接法（NJ）自检 2 000 次结果，分枝上的数字为自举检验值（%），略去小于 50% 的数值。标尺为遗传距离。图中所示，藏羚羊皮蝇应该为一个独立的种。The Rooted Neighbor-Joining phylogenetic tree with 2 000 replications of partial COI encoding E4-COOH regions of *H.* spp. and other warbles. It suggests that *H.* sp. found in Tibetan antelopes should be a distinct species.

3 讨论

牛皮蝇种的鉴别主要判断依据为 3 龄幼虫气门板，第 10 腹节腹面的刺，以及伪头的特征(James，1947)。继 Zumpt(1965)专著之后，Douglas 等(1998)，Otranto 等(2003a，2003b)和 Li 等(2004) 等相继发表和完善了鹿皮蝇、驯鹿皮蝇、牛皮蝇、纹皮蝇、红鹿皮蝇以及中华皮蝇的以上 3 个特征的描述。本文中观察到牛皮蝇，纹皮蝇和中华皮蝇的特征与他们的描述基本一致。与牛皮蝇伪头消失的突起以及纹皮蝇和中华皮蝇突起残基不同(Zumpt，1965)，藏羚羊皮蝇具有 2 个大的圆锥形肉质突起，这是其明显区别其他 3 种皮蝇的标志。并且考虑到伪头第 2 节上巨大的刺，第 10 腹节腹面前排巨大连续的刺，藏羚羊皮蝇甚至很有可能不属于皮蝇属 *Hypoderma*。

细胞线粒体 COI 基因属于细胞色素 C 氧化酶的一个亚单位，本研究之所以用引物 UEA7 和 UEA10 扩增线粒体 COI 基因片段，是因为这一片段已被证明具有昆虫种属特异性，这一区域是昆虫之间变化最高的区域(Zhang and Hewitt，1997)。Otranto 等(2003)对狂蝇科内能引起专性蝇蛆病的 18 个属种的这一片段进行了研究，指出皮蝇科种内变异率为 0.14% ~ 1.59%，种间变异率为 8.4% ~ 16.4%。而藏羚羊皮蝇种内变异率为 0.84%，种间变异率为 11.9%，都符合 Otranto(2003b)的报道。同样，系统进化分析的结果也表明：藏羚羊皮蝇应该是一个与已报道种类不同的种。

调查中发现藏羚羊皮蝇专寄生于藏羚羊而不寄生于同一地区的牦牛；同样，寄生于牦牛的牛皮蝇、纹皮蝇和中华皮蝇也没有在藏羚羊身上发现。此外，藏羚羊皮蝇寄生部位为藏羚羊臀部，而大多数皮蝇的寄生部位为宿主背部(刘文道，1993；孔繁瑶，1997)。因此，宿主特异性和寄生部位特异性也表明藏羚羊皮蝇可能是一个新种。

藏羚羊有一种“跑蜂”现象，推测与皮蝇的感染有关，可能是其躲避皮蝇感染的一种逃避方式，具体情况有待于进一步研究。

鉴于藏羚羊皮蝇在形态学和分子生物学上与中国现有记录的 3 种皮蝇的明显差异，我们认为藏羚羊皮蝇可能是一种尚未被报道的皮蝇新种或新纪录种，为中国第四种皮蝇。

参 考 文 献 (References)

Cai JZ，Ma YQ，Yu MS，Wang M，Li CH，Liu SC，Wang YM，2006. Investigation on warble larva infestion in Tibeten antilopes，2006. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*，42(2)：25 – 26. [蔡进忠，马有泉，于明胜，汪明，李春花，刘生财，王玉梅，2006. 藏羚羊皮蝇幼虫感染情况调查报告. 中国兽医杂志，42(2)：25 – 26]

Colwell DD，Martinez-Moreno FJ，Martinez-Moreno A，Hernandez-Rodriguezs S，de la Fuente-Lopez C，Alunda JM，Hall MJR，1998. Comparative scanning electron microscopy of third-instar *Hypoderma* spp. (Diptera：Oestridae). *Med. Vet. Entomol.*，12(2)：181 – 186.

Otranto D，Colwell DD，Traversa D，Stevens JR，2003a. Species identification of *Hypoderma* affecting domestic and wild ruminants by morphological and molecular characterization. *Med. Vet. Entomol.*，17(3)：316 – 325.

Otranto D，Traversa D，Guida B，Tarsitano E，Fiorente P，Stevens JR，2003b. Molecular characterization of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene of Oestridae species causing obligate myiasis. *Med. Vet. Entomol.*，17 (3)：307 – 315.

Otranto D，Traversa D，Colwell DD，Guan G，Giangaspero A，Boulard C，Yin H，2004. A third species of *Hypoderma* (Diptera：Oestridae) affecting cattle and yaks in China：molecular and morphological evidence. *J. Parasitol.*，90(5)：958 – 965.

Otranto D，Colwell DD，Pape T，2005. *Hypoderma sinense*：solving a century-old enigma. *Med. Vet. Entomol.*，19(3)：315 – 321.

James MT，1947. The Flies That Cause Myiasis in Man. Government Printing Office，Washington D.C. 106 – 112.

Kong FY，1997. Domestic Animal Parasitology. China Agricultural University Press，Beijing. 276 – 281. [孔繁瑶，1997. 家畜寄生虫学. 北京：中国农业大学出版社. 276 – 281]

Liu WD，1993. Illustrated Handbook of Chinese Yak Parasites. Qinghai People Press，Xining. 7 – 9. [刘文道，1993. 中国牦牛寄生虫图鉴. 西宁：青海人民出版社. 7 – 9]

Li W，Nasu T，Ma YQ，Zhu XY，Makimuras S，2004. Scanning electron microscopic study of third-instar warbles in yak in China. *Vet. Parasitol.*，121(2)：167 – 172.

Harwood RF，James MT，1979. Entomology in Human and Aanimal Health. Macmillan Publishing Co. Inc.，New York. 307 – 310.

Zhang DX，Hewitt GM，1997. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Mol. Biol.*，6(2)：143 – 150.

Zumpt F，1965. Myiasis in Man and Animals in the Old World. Butterworths，London，U.K. 141 – 229.

(责任编辑：袁德成)